赖氨酰内肽酶特性及其表达、应用的研究进展

曾杰*

（江苏恒瑞医药股份有限公司 国家靶向药物工程技术研究中心 连云港 222047）

摘要：赖氨酰内肽酶是一种重要的工具酶，广泛应用于科学研究及工业化生产。目前市场上的赖氨酰内肽酶大多是从天然微生物中提取获得，其高昂的价格限制了其广泛运用，重组表达能够解决产量的难题。本文首次对赖氨酰内肽酶进行了综述，包括赖氨酰内肽酶的来源、结构、功能性质、及其主要应用，并重点总结了近年来的重组表达进展，同时对今后的研究方向进行了展望。

关键词：赖氨酰内肽酶，Lys-C，工具酶，重组表达

Advances in Study of Properties, Recombinant Expression and Applications of Lysyl Endopeptidase

Jie Zeng*

（Jiangsu Hengrui Medicine Co., Ltd., National Engineering Technology Research Center of Targeted Drugs, China, LianYunGang, 222047）

Abstract Lysyl endopeptidase is an important enzyme as a tool for biotechnological purposes and industrial production. However, its applications are obstructed by its high costs of production, due to the current lysyl endopeptidase products are extracted from the native bacteria with very low yields. Nevertheless, the recombinant expression system have solved this problem perfectly. This article presented a review of recent progress in lysyl endopeptidase for the first time. In this paper, we mainly focus on the origins, structure and function of lysyl endopeptidase. Furthermore, the successful expression of recombinant lysyl endopeptidase were aslo summarized and analyzed. In addition, the potential perspective of lysyl endopeptidase for future research were further discussed.

Key words Lysyl endopeptidase Lys-C Achrornobacter protease I Protease IV Recombinant expression

赖氨酰内肽酶（lysyl endopeptidase，Lys-C，EC 3.4.21.50）是一种特异性酶切赖氨酸 C 端氨基酸残基（包括脯氨酸、谷氨酸）的丝氨酸蛋白酶，广泛应用于蛋白质组学研究、多肽测序、胰岛素的制备、磷酸化肽的鉴定、二硫键分析、N-聚糖分析、糖化血红蛋白的检测、隐形眼镜的清洗等，具有巨大的商业应用潜力。

*通信作者。Tel：+86-18888135200；E-mail：zeng2408@163.com

1. 赖氨酰内肽酶概述

1.1 来源

赖氨酰内肽酶 Lys-C 主要来源于表 1 中的 3 种微生物，分别为无色杆菌（*Achromobacter lyticus*）、产酶溶杆菌（*Lysobacter enzymogenes*）和铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）。其名称根据来源不同也多种多样，例如来源于 *A. lyticus* M497-1 的 Lys-C 又叫 API（Achrornobacter protease I）[1]、A-LEP（Achromobacter lysyl endopeptidase）[2]、及无色肽酶（Achromopeptidase）；来源于 *L. Enzymogenes* ATCC 29487 及 *Lysobacter sp.* IB-9374 的 Lys-C 又分别叫 Le-LEP（*Lysobacter enzymaogenes* lysyl endopeptidase）和 Ls-LEP（*Lysobacter sp*. Lysyl endopeptidase）[2]；来源于 *P. aeruginosa* 的 Lys-C 又叫 Protease IV[3]，及 Ps-1[4,5]。其代表菌株有 *P. aeruginosa* PAO1、*P. aeruginosa* PA103-29、及 *P.aeruginosa* 6294。

1.1.1 无色杆菌：来源于 *A. lyticus* 的 API 最早由日本学者 Masaki 等[1]等于 1978 年分离获得。当时 Masaki 等从 *A. lyticus* M497-1 的培养液中分离出了 3 个碱性蛋白酶（Protease I、II、III），但只有 Protease I（API）对赖氨酸残基的羧基端具有特异的水解活性。由于该酶的高特异性与高酶活性（酶活性是胰蛋白酶的 10 倍），Lys-C 迅速成为当时的研究热点，各厂家及科学家致力于开发不同微生物来源的 Lys-C。

1.1.2 溶杆菌：来源于 *L. enzymogenes* ATCC 29487 的 Lys-C 最早由 Jekel 等[6]提取获得。该菌株除了能够产生 Lys-C（Le-LEP），还能产生α裂解内肽酶（Alpha-lytic endopeptidase，EC 3.4.21.12）和精氨酰内肽酶（Arginyl endopeptidase，Arg-C）[7]。其高产菌株分别为 *Lysobacter sp.* IB-9374[2]及 *L.enzymogene* ATCC 27796[8]。

1.1.3 铜绿假单胞菌：从 *P. aeruginosa* 中分离纯化获得的 Protease IV 也具有赖氨酰内肽酶活性[9]。*P. aeruginosa* 是一种病原微生物，能够导致发热，癌症，免疫缺陷等[3]，还能够对眼部及肺部造成组织损害[10]，其分泌的 Protease IV 能够降解宿主菌的重要免疫蛋白，如补体和 IgG 等[8]。通过硫酸铵沉淀法处理培养基上清，随后阴离子交换层析及凝胶过滤层析，可获得 Protease IV，其酶比活最高为 89 U/mg[4]，大大高于 *A. lyticus* 及 *L.enzymogene* 来源的 Lys-C。

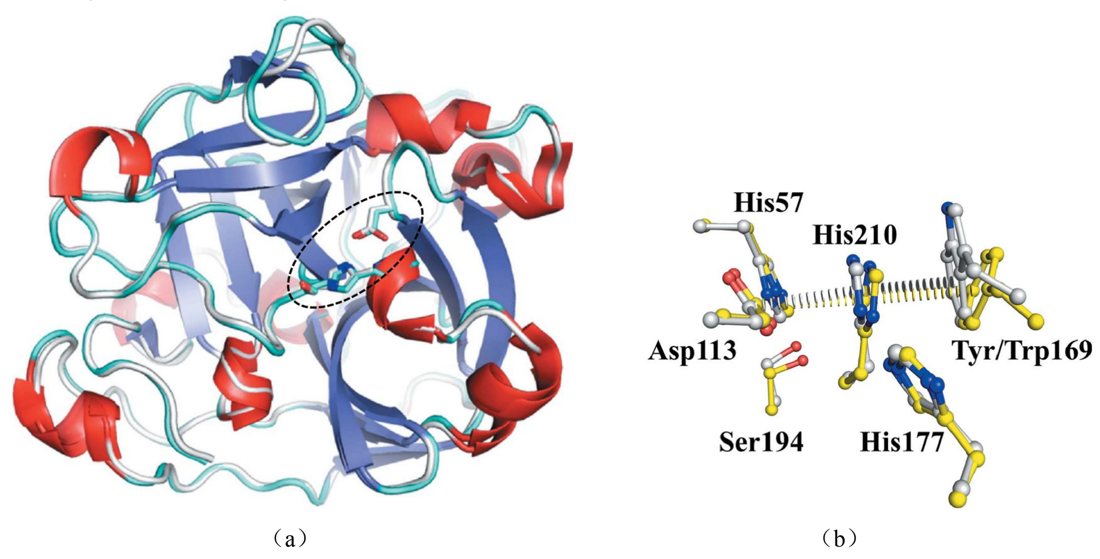
1.2 结构

1.2.1 基因结构：Lys-C 是以前酶原（pre-proenzyme）的形式生物合成[2]，包含信号肽（signal peptide）、前导肽（pro-peptide）、成熟肽酶（mature peptidase）和延伸肽（extension peptide）这 4 个部分。来源于 *A. lyticus* 与 *L. Enzymogenes* 的 Lys-C 前酶原分别为 653、670 个氨基酸[8]，而来源于 *P. aeruginosa* 的 Lys-C 前酶原只有 462 个氨基酸，包含信号肽、前导肽及成熟肽酶[11]。其中，*A. lyticus* 与 *L. Enzymogenes* 的成熟肽酶 Lys-C 氨基酸序列完全一致。

1.2.2 蛋白质结构：Lys-C 含有 3 对二硫键，其中二硫键 C6-C216 是其在碱性 pH 条件下（pH8.5-10.7）具有最佳酶活性与耐变性剂的决定因素。其催化三联体为 H57、D113 与 S194，分别对应于胰蛋白酶的催化三联体 H57、D102 与 S195[12]。*P. aeruginosa* 来源的 Protease IV

也具有类似的催化三联体，其邻近的 H116 与 S200 的点突变能够加速前酶原自发酶解为成熟的 Protease IV[13]。暗示 H116 与 S200 对其蛋白构向的稳定具有重要作用，同时也暗示了酶原自发降解（autodigestion）是其形成成熟 Protease IV 的重要步骤。

1.2.3 晶体结构： Lys-C 容易自发降解也是制备晶体的一个难点。2013 年，Ohnishi 等[14]对 Lys-C 晶体研究证实了 H57、D113 及 S194 是构成该丝氨酸蛋白酶的催化三联体。同时发现，催化三联体 D113 与邻近的 H210、W169 残基形成π–π堆积作用，从而使 D113 与溶剂隔离，这种独一无二的结构特征使得 Lys-C 能在宽泛的碱性条件下保持功能稳定。2014 年，Asztalos 等[15]通过添加共价抑制剂 TLCK（N-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone），获得了分辨率更高的 Lys-C 晶体，为 Lys-C 催化中心的氢键研究奠定了基础。



Lys-C 叠加图。（a）灰色代表 *Lysobacter* 来源的 Lys-C、青色代表 *A. lyticus* 来源的 Lys-C，椭圆部分为催化三联体；（b）黄色代表 *Lysobacter* 来源的 Lys-C、灰色代表 *A. lyticus* 来源的 Lys-C

图 1 赖氨酰内肽酶的晶体结构[15]

Figure 1 Crystal structure of lysyl endopeptidase

1.3 性质

1.3.1 特异性： Lys-C 的底物结合位点又叫作 S1 专一性口袋（S1 Specificity Pocket），其空间几何特征决定了其高度特异性。TLCK 能够替代多肽底物占据 S1 专一性口袋，因此能有效抑制 Lys-C 的酶活性。底物结合位点的 D225 与邻近的 T189、S214 形成严紧的 S1 口袋，只能容纳线性的侧链。在众多氨基酸中，只有精氨酸与赖氨酸的线性侧链足够长，其侧链末端能够接触到 S1 口袋底部，但精氨酸侧链的胍基与 D225 存在空间位阻，阻碍了精氨酸与 S1 口袋的结合[15]。这种独特的几何空间结构阐释了其只能专一性酶切赖氨酸 C 端氨基酸残基的原理。

表 1 赖氨酰内肽酶的底物特异性

Table 1 substrate specificity of lysyl endopeptidase

底物	Km/ Kcat (mM-1 s-1)		
	API (*A. Lyticus*)[1,16]	Lys-C (*Lysobacter sp.* IB-9374) [2]	Protease IV (*P. Aeruginosa*) [5]
Tos-Gly-Pro-Lys-pNA	/	/	4.4
Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	/	/	0
Val-Leu-Lys- pNA	/	/	2.6
Lys-pNA	1.75	1	0
Arg-pNA	0	/	/
Bz-Arg-pNA	0	/	/
Bz-Lys-pNA	12.3	42	/
Ac-Lys-pNA	/	115	/
Bz-Lys-OMe	2480	29 000	/
Tos-Lys-OMe	5700	14 600	/
Tos-Arg-OMe	0.14	/	/
Bz-Orn-OMe	10.4	13	/

Note: “/” Mean not report.

1.3.2 最适 pH：中性环境（pH6.0-7.0）是蛋白酶将底物转化为多肽片段的最佳条件[12,17]。W169 与 H210 在催化中心处的堆积作用，决定了 Lys-C 的最适 pH 为碱性条件，因此该位点的突变，成为解决问题的关键。Shiraki 等[18]通过点突变获得变体 H210S 与 H210A，其催化活性分别为 Lys-C 的 2 倍或相当，且最适 pH 改变为中性环境。但对 W169 进行突变的变体酶活性下降较大[19]，可能由于具有大体积疏水侧链的 W169 对活性中心 D113 的去溶剂化保护不复存在，因此使得 Lys-C 的酶活性功能大幅下降。

1.3.3 自降解：Lys-C 容易发生自降解，是限制其应用的一个重要因素。对于 Protease IV 来说，其自降解位点为 K30、K48、K49、K155 和 K203，可分别产生 5kD、6kD、13kD、18kD 和 22kD 降解片段[3]。将这些赖氨酸位点进行突变或化学修饰，或许能够减弱自降解趋势，提高 Lys-C 的稳定性，但也可能带来空间结构的改变而影响酶活性。2016 年，Zhao 等[3]通过改变溶剂条件，实现了 Lys-C 的稳定保存，即在高盐（≧2M NaCl）及低 pH（<4）条件下能够减少自激活并稳定保存成熟肽酶 Protease IV。

表 2 赖氨酰内肽酶的特征

Table 2 Characterization of lysyl endopeptidase

性质	Lys-C (*A. Lyticus, L. Enzymogenes*)	Protease IV (*P. Aeruginosa*)
等电点	6.8-6.9[2,12]	8.7[3, 5]
最适温度	50℃[2]	45℃[5]
最适 pH	pH8.5-10.7[2,12], pH9[15]	pH10.0[5]

耐盐性	5-7M 尿素、0.1% SDS[12,15]	8M 尿素[3]
抑制酶活条件	NaCl，盐酸胍[8]	≥2 M NaCl or pH<4[3]
抑制剂	TLCK(N-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone), PMSF(Phenylmethanesulfonyl fluoride)[12]	DTT, 2-巯基乙醇[3, 5]; TLCK(totally abolish), PMSF(partially inhibit)[5]

2. 赖氨酰内肽酶的天然表达

赖氨酰内肽酶主要来源于 3 种菌株，其中无色杆菌 *A. lyticus* M497-1 的天然表达产量为 32 U/L（见表 1）。2002 年，Chohnan 等[2]从来自沙土的 30000 个微生物中筛选出一株高产菌株 *Lysobacter sp.* IB-9374，在 30℃条件下有氧发酵 225h（9.4 天），分泌到培养基上清中的 Lys-C 对底物 Bz-Lys-*pNA* 的水解活性达到最高（183 U/L）。2009 年，Kuhlman 等[8]利用 *L.enzymogene* ATCC 27796 菌株天然表达 Lys-C，成功放大到 40L 发酵规模，通过培养基优化，上清表达产量达到 5.6mg/L（折合为 50.96 U/L）。2012 年，Conibear[20]等报道了 *P. aeruginosa* 菌株天然表达的产量为 28.01 U/(L·OD_{600})。

目前赖氨酰内肽酶的市场主要由国外企业垄断，但这些国外企业主要采用的是天然表达获得 Lys-C。其产量低，纯化工艺复杂，生产周期长，其高昂的成本限制了 Lys-C 的广泛应用，重组表达能够解决产量的难题，极大的降低生产成本。

表 3 赖氨酰内肽酶的天然表达

Table 3 Native expression of lysyl endopeptidase

来源	产酶菌株	天然表达产量	酶比活
无色杆菌	*A. lyticus* M497-1[1]	32 U/L[2]	
溶杆菌	*Lysobacter* sp. IB-9374[2]	183 U/L[2]	9.1 U/mg[3]
	L. Enzymogenes ATCC 29487[5]	15 U/L[2]; 5.6mg/L (折合 50.96 U/L)[7]	
铜绿假单胞菌[15]	*P. aeruginosa* PAO1	12.05 U/(L·OD_{600})	14.6 U/mg[3]; 52-89 U/mg[4]
	P. aeruginosa PA103-29	NR	
	P. aeruginosa 6294	28.01 U/(L·OD_{600})	

Note: NR= Not Report.

One U of Lys-C activity is defined as the amount of enzyme which converts 1 μmol of substrate to product in 1 min under room temperature[4] or 30℃[3].

3. 赖氨酰内肽酶的原核重组表达

3.1 密码子偏好性

大肠杆菌的密码子偏好性对 Lys-C 的重组表达具有重要影响。从 *A. lyticus* 的基因组中 PCR 扩增编码 API 的基因片段，构建到搭载 trc 启动子的 pKK233-2 的表达载体中，在宿主菌 *E.coli* 中成功重组表达，但 IPTG 的诱导并不能提高表达产量[21]，因转录水平受到限制而影响了表达产量。为了降低密码子偏好性的限制，在不进行基因优化的前提下，选择无内源 Protease IV 表达的恶臭假单胞菌（*P. putida*）为宿主菌，以 pUCP20 为表达载体（*lac* 启动子）

重组表达了 Protease IV，其产量相比 *P. aeruginosa* 天然表达提高了 5 倍[13]。这两个例子暗示了密码子偏好性的对原核重组表达的重要性。

3.2 表达系统的选择

不同的宿主菌及表达载体系统对 Lys-C 的重组表达影响很大。2016 年，Stressler 等[7]利用 *E.coli* 密码子偏好性对来自 *L. enzymogenes* ATCC 27796 的 Lys-C 及其 N 端前导肽（MGSK）进行密码子优化后，选择 2 个表达载体系统分别在 5 个大肠杆菌宿主菌中进行重组表达。BL21(DE3)、BL21(DE3)[pLys-S] 和 JM109(DE3)采用 pET 系列表达载体（IPTG 诱导），JM109 和 DSM 14459 采用 pJOE 表达载体（鼠李糖诱导）。其中，BL21(DE3)与 BL21(DE3)[pLys-S] 宿主菌没有获得阳性转化子，获得阳性转化子的 JM109(DE3)却无表达。然而，在 JM109 和 DSM 14459 宿主菌中成功获得重组表达。经过培养条件优化，在 1L 生物反应器中，宿主菌 JM109 重组表达 Lys-C 的酶活性最高达 9,340 ± 555 $nkat_{Tos\text{-}GPK\text{-}pNA}/L_{culture}$。（折合为 560±33 U/L）。将 MGSK-Lys-C 构建到 pET 表达载体中，同样在 JM109 中重组表达，产量仅为 pJOE 表达载体的 20%。

3.3 前导肽及信号肽的影响

对于很多蛋白酶来说，在体外及体内前导肽具有促进蛋白折叠的功能，将 *L. enzymogenes* ATCC 27796 的信号肽-N 端前导肽（*pre-N-pro*）基因构建到 pJOE 表达载体中，在 JM109 中重组表达，获得的 pre-N-pro 多肽作为复性剂能够促进 MGSK-Lys-C 的折叠。在复性时添加 pre-N-pro 多肽，Lys-C 的酶活性可提高 58 倍[7]。本实验室也证实，在缺失前导肽的情况下，检测不到重组表达产物的酶活性。另外，不同信号肽对 Lys-C 的表达产量差异很大。

3.4 融合表达策略

BL21(DE3)与 pET 载体系统配合，无疑是目前原核表达系统最流行的组合。但由于 Lys-C 对宿主菌的毒性作用，增加了重组表达的难度，采用融合表达是一个行之有效的策略。2016 年，Zhao 等[3]将 Protease IV 酶原（N 端前导肽+成熟肽酶）基因的密码子优化后与硫氧还蛋白（Trx）基因融合，在 BL21(DE3)中成功重组表达。融合蛋白 Trx-pro-protease IV 的 5L 发酵产量为 1.7g/L，在其发表的专利 CN105950593A[11]中进一步保护了该制备方法。通过高压均浆破碎获得包涵体 Trx-pro-protease IV，在 25℃条件下依次经历变性 3-4h、pH10.0 条件复性 14h、pH7-8 条件放置 5-6h 自激活，随后 4℃条件下硫酸铵沉淀 4h，沉淀的蛋白重悬后，依次进行镍柱亲和层析、超滤浓缩、凝胶过滤层析，获得 Lys-C 的产量为 36.6mg/L（折合为发酵体积）。虽然融合表达能够减弱 Lys-C 对宿主菌的毒性作用，但同时增加了纯化步骤而减少收率，且融合蛋白分子量较大，经过酶切去除 Trx 后，Lys-C 的产量会打折扣。

3.5 分泌表达策略

直接分泌表达重组蛋白的最大优点就是纯化步骤简单，收率高[22]，但因 Lys-C 具有促进大肠杆菌裂解倾向的毒性作用，直接分泌表达 Lys-C 存在诸多难点。例如，难以获得阳性转化子，即使获得阳性转化子，也会遇到生长缓慢，质粒容易丢失的问题，最终导致产量不

高。本实验室通过优化培养基组分限制其泄漏表达，从而克服了生长缓慢的问题。在诱导表达的时候，改善诱导表达条件，使得质粒易丢失的问题得到解决，最终 5L 高密度发酵产量可达到 4000U/L（折合 440mg/L），远高于目前文献报道的表达水平。

4. 赖氨酰内肽酶的酵母重组表达

Lys-C 来源于原核生物，没有翻译后修饰，利用真核表达系统的报道较少。2014 年，Asztalos[15]等在巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）KM71H 中成功重组分泌表达 Lys-C 的变体 K30R 及野生型 Lys-C，其表达载体为 pPICZα。2015 年，马妍等[23]也尝试了在 *P. pastoris* X-33 中重组表达 Lys-C（pPICZα-Lys-C）。虽然根据 *P. pastoris* 密码子偏好性进行基因优化，但表达产量低，且不稳定。对于很多蛋白酶来说，在体外及体内前导肽具有促进蛋白折叠的功能[7]，该重组表达缺少了 N 端前导肽，可能与重组表达的失败有着重要的关联。

表 4 赖氨酰内肽酶的重组表达

Table 4 Recombinant expression of lysyl endopeptidase

来源	宿主菌	表达载体	表达产物	产量	文献
A. lyticus M497-1	*E.coli*	pKK233-2	酶原（未基因优化）	0.48mg/L（a）	Ohara T，1989 [21]
A. lyticus M497-1	*E. coli* JA221	pKYN200	酶原变体 H210S、W169F	0.2-0.4mg/L（b）	Ito L，2010 [24]
L. enzymogenes ATCC 27796	*E. coli* JM109	pJOE	酶原 MGSK-Lys-C	560±33 U /L（d）	Stressler T，2016 [7]
P. aeruginosa	*E. coli* BL21(DE3)	pET32a	融合酶原 Trx-pro-protease IV	36.6mg/L（b） 1.7g/L（c）	CN105950593A，2016 [11] Zhao MZ,2016 [3]
A. lyticus	*P. pastoris* KM71H	pPICZαA	酶原变体 K30R	NR	Asztalos P，2014 [15]
A. lyticus	*P. pastoris* X-33	pPICZαA	成熟肽酶	NR	Ma Y，2015 [23]

Note: NR=Not Report. 酶原=N 端前导肽+成熟肽酶

a: 酶原纯化产量；b: 成熟肽酶纯化产量；c: 融合蛋白产量；d: 复性后产量

5.应用

5.1 蛋白质组学

蛋白质组学（Proteomics）是一门致力于大规模研究蛋白质结构与功能的学科，蛋白质复合物的完全酶解是现代高分辨率、高通量的质谱分析法鉴定与定量的关键步骤。赖氨酰内肽酶是蛋白质组学研究必不可少的工具酶[25]，2017 年，Guo 等[26]证实采用微波辅助胰蛋白酶与 Lys-C 酶解，可被鉴定的多肽和蛋白质数量最高。2017 年，Paulo 等[27]也阐明了 Lys-C 与胰蛋白酶组合使用能够鉴别出更多的蛋白，比单独应用 Lys-C 多鉴别出 10%的蛋白和 30%的多肽。

5.2 多肽测序

联合 Lys-C 与 Lys-N 酶解，随后 LC-MS/MS 分析，可将混合蛋白中将不同蛋白质的 N 端进行测序鉴定，包括乙酰化的 N 端，蛋白异构体等[28]。2017 年，Guan 等[29]联合这两种酶结合串联质谱分析，成功鉴定出含有相同氨基酸残基肽段的 7 对等重前体离子（isobaric precursor ions）（如 TYFPHFDLSHGSAQVK 与 KTYFPHFDLSHGSAQV）。Lys-C 酶解后的肽段 C 端为 Lys，Lys-N 酶解后的肽段 N 端为 Lys[30]，该特点能够直接分辨离子类型，大大简化了多肽从头测序（*de novo* peptide sequencing）对于鉴定等重前体离子的难题[31]。

5.3 胰岛素制备

人胰岛素由 21 个氨基酸的 A 链与 30 个氨基酸的 B 链组成，其中 B30 为苏氨酸，对胰岛素的生物活性或生理特性几乎无影响，B29 是赖氨酸，正好是 Lys-C 的酶切位点。Tofteng 等[32]采用固相合成的方式成功合成了人胰岛素原，其 C 肽为 GEEEK，N 端前导肽为 EEEEK，能促进其有效折叠，Lys-C 能够一步切除 C 肽及 N 端前导肽获得缺失 B30 位（desB30）的胰岛素类似物。已上市的地特胰岛素（Insulin Detemir）、德谷胰岛素（Insulin Degludec）及门冬胰岛素（Insulin Aspart）均属于 desB30 胰岛素类似物[33]。在专利 CN 102816785 A[34]中也公开了应用 Lys-C 制备甘精胰岛素及其类似物的方法。

联合羧肽酶 B 与胰蛋白酶也能够去除胰岛素原的前导肽及 C 肽[35]，但是这两种酶对碱性氨基酸赖氨酸及精氨酸都具有选择性，导致胰岛素副产物增加、增加纯化难度，降低胰岛素收率。在胰岛素的制备方面，Lys-C 作为关键工具酶，因能简化工艺步骤，大大降低纯化成本，提高收率，减少杂质，而具有巨大的工业化应用价值。

5.4 其他应用

5.4.1 磷酸化肽的鉴定：磷酸化修饰是真核生物中最普遍的蛋白质翻译后修饰之一，是调节细胞信号转导及蛋白激酶与底物相互的主要机制。2014 年，Cao 等[36]利用 Lys-C 及胰蛋白酶结合 MS，成功鉴定了肿瘤相关的转录因子人锌指蛋白-36（zinc finger protein 36）的主要磷酸化肽。该方法同样能用于鉴定蛋白激酶的磷酸化位点，进而揭示蛋白激酶对底物选择性的机制[37]。

5.4.2 二硫键分析：传统的二硫键分析方法通常需要较长时间的酶解与较高浓度的蛋白内切酶，但是在偏碱性条件下孵育时间过长会导致二硫键错配；缩短酶解时间及降低 pH 值，又会导致不完全酶解。2016 年，Cheng 等[38]针对这些问题，开发出一种快速而高效的 Lys-C 酶解方法，不仅使产生的二硫键多肽信号提高了 10 倍，而且使二硫键错配降低到不高于 0.05%。

5.4.3 N-聚糖分析：重组单克隆抗体的 N-聚糖分析（N-glycan analysis）通常需要肽 N-糖苷酶 F（PNGase F）去除寡聚糖后，进行 2-氨基苯甲酰胺标记（2-AB labeling），随后进行高效液相色谱分析及荧光检测。2012 年，Merck 公司开发出了一种更加高效的分析方法，其关键在于联合 Lys-C 与胰蛋白酶快速酶解生成糖肽[39]。

5.4.4 糖化血红蛋白的检测：糖化血红蛋白（GHb）对评价糖尿病患者的整体情况具有重要

意义。2013 年，宋智心等[40]将 Lys-C 与国际临床化学组织推荐的 Glu-C（金黄色葡萄球菌 V8 蛋白酶）对 GHb 的检测进行比较，不仅能够获得一致的结果，而且 Lys-C 的酶解效率更高，并能有效降低实验成本，证明了 Lys-C 在质谱法测定 GHb 方法中的应用优势。

6. 结语和展望

Lys-C 是一种重要的工具酶，广泛应用于蛋白质组学研究、多肽测序、胰岛素的制备、磷酸化肽的鉴定、二硫键分析、N-聚糖分析、糖化血红蛋白的检测等，具有巨大的商业应用潜力。目前，市场上的赖氨酰内肽酶主要由国外企业生产供应，价格昂贵。例如 Sigma Aldrich 生产的 Lys-C 市场价为¥5000/100 KU，Merck 生产的测序级 Lys-C 市场价为¥2500/5μg，美国 AbSci 生产的 Recombinant Protease IV 市场价为¥11850/mg 等。大部分厂家采用天然表达的方式，产量低，纯化工艺复杂，高昂的成本及价格限制了工业化的应用。重组表达能够解决产量的难题。

然而目前为止，国内外并没有报道关于 Lys-C 的综述。本文首次对 Lys-C 的来源、结构、性质、及其应用等进行了综述，并重点总结了近年来的重组表达进展。其重组表达难点在于以下几方面：1、Lys-C 能够促进宿主菌的自溶解倾向，对宿主菌具有毒性作用，且重组表达载体转化宿主菌难以获得阳性菌落[7]；2、重组表达 Lys-C 的宿主菌生长缓慢，且质粒容易丢失，导致生产不稳定；3、Lys-C 的序列本身存在很多赖氨酸，容易自激活并自我降解，导致产量不高。

通过本文对近几年研究成果的综述，从以下三个方面可有效改善上述弊端：1、采用融合表达、包涵体表达策略，可减弱 Lys-C 对宿主菌的毒性作用；2、重组表达 Lys-C 的菌株生长缓慢，且质粒容易丢失，可能与低水平的 Lys-C 泄露表达有关，选择调控更加严谨的宿主菌（如 BL21(DE3)pLys）可限制泄露表达；3、将 Lys-C 氨基酸序列的赖氨酸位点进行突变或化学修饰，能够减弱自降解趋势，提高 Lys-C 的稳定性。结构决定功能，通过对 Lys-C 结构的研究（如氨基酸的突变，截短等）开发酶活更高、更稳定的 Lys-C 变体，是今后的研究难点与方向，并有望开发出更优质的 Lys-C，打破长期以来昂贵的进口 Lys-C 的垄断地位。

8. 参考文献

[1]Masaki T，Nakamura K，Isono M，et al. A new proteolytic enzyme from *Achromobacter lyticus* M497-I. Agricultural and Biological Chemistry，1978，42（7）：1443-1445.

[2]Chohnan S，Nonaka J，Teramoto K，et al. *Lysobacter* strain with high lysyl endopeptidase production. Federation of European Materials Societies Microbiology Letters，2002，213（1）：13-20.

[3]Zhao M Z，Cai M，Wu F L，et al. Recombinant expression，refolding，purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* protease IV in *Escherichia coli*. Protein Expression and Purification，2016，126：69-76.

[4]Elliott B W，Cohen C. Isolation and characterization of a lysine-specific protease from

Pseudomonas aeruginosa. Journal of Biological Chemistry，1986，261（24）：11259-11265.
[5]Engel L S，Hill J M，Caballero A R，et al. Protease IV, a Unique Extracellular Protease and Virulence Factor from Pseudomonas aeruginosa. Journal of Biological Chemistry，1998，273（27）：16792-16797.
[6]Jekel P A，Weijer W J，Beintema J J. Use of endoproteinase Lys-C from *Lysobacter enzymogenes* in protein sequence analysis. Analytical Biochemistry，1983，134（2）：347-354.
[7]Stressler T, Eisele T, Meyer S, et al. Heterologous expression and pro-peptide supported refolding of the high specific endopeptidase Lys-C. Protein Expression and Purification，2016，118：31-38.
[8]Kuhlman P A，Chen R J，Alcantara J, et al. Rapid purification of Lys-C from *Lysobacter enzymogenes* cultures. BioProcess Techinical，2009，28-38.
[9]Oh J，Li X H，Kim S K，et al. Post-secretional activation of Protease IV by quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa. Scientific Reports，2017，7（1）：4416.
[10] Caballero A，Thibodeaux B，Marquart M，et al. *Pseudomonas* keratitis: protease IV gene conservation，distribution，and production relative to virulence and other *Pseudomonas* proteases. Investigative Ophthalmology & Visual Science，2004，45（2）：522-530.
[11]赵明治，徐平，吴飞林，等. 一种赖氨酰肽链内肽酶的原核重组表达与制备方法. 中国专利，CN105950593A，2016-09-21.
Zhao M Z，Xu P，Wu F L，et al. A process for preparation of Lysyl Endopeptidase by prokaryotic recombinant expression. Chinese patent，CN105950593A，2016-09-21.
[12]Tsunasawa S，Masaki T，Hirose M，et al. The primary structure and structural characteristics of Achromobacter lyticus protease I，a lysine-specific serine protease. Journal of Biological Chemistry，1989，264（7）：3832-3839.
[13]Traidej M，Marquart M E，Caballero A R，et al. Identification of the active site residues of *Pseudomonas aeruginosa* protease IV - Importance of enzyme activity in autoprocessing and activation. Journal of Biological Chemistry，2003，278（4）：2549-2553.
[14]Ohnishi Y，Yamada T，Kurihara K，et al. Neutron and X-ray crystallographic analysis of Achromobacter protease I at pD 8.0：protonation states and hydration structure in the free-form. Biochimica et Biophysica Acta，2013，1834（8）：1642-1647.
[15]Asztalos P，Müller A，Hölke W，et al. Atomic resolution structure of a lysine-specific endoproteinase from *Lysobacter enzymogenes* suggests a hydroxyl group bound to the oxyanion hole. Acta crystallographica. Section D，Biological Crystallography，2014，70（7）：1832-1843.
[16]Masaki T，Fujihashi T，Nakamura K，et al. Studies on a new proteolytic enzyme from Achromobacter lyticus M497-1. II. specificity and inhibition studies of Achromobacter protease I. Biochimica et Biophysica Acta，1981，660（1）：51-55.
[17]Tizon R U，Serrano A E，Traifalgar R F. Effects of pH on amylase，cellulase and protease of the Angelwing clam，Pholas orientalis. European Journal of Experimental Biology，2012，2（6）：2280-2285.
[18]Shiraki K，Sakiyama F. Histidine 210 mutant of a trypsin-type Achromobacter protease I shows broad optimum pH range. Journal of Bioscience and Bioengineering，2002，93（3）：331-333.
[19]Shiraki K，Norioka S，Li S，et al. Electrostatic role of aromatic ring stacking in the pH-sensitive modulation of a chymotrypsin-type serine protease，Achromobacter protease I.

European Journal of Biochemistry，2002，269（16）：4152-4158.
[20] Conibear T C，Willcox M D，Flanagan J L，et al. Characterization of protease IV expression in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Journal of Medical Microbiology，2012，61（2）：180-190.
[21]Ohara T，Makino K，Shinagawa H，et al. Cloning，nucleotide sequence，and expression of Achromobacter protease I gene. Journal of Biological Chemistry，1989，264（34）：20625-20631.
[22]Srinivasa B K，Pulicherla K K，Antony A，et al. Cloning and expression of recombinant human GMCSF from Pichia pastoris GS115--a progressive strategy for economic production. American Journal of Therapeutics，2014，21（6）：462-469.
[23]马妍，付志成，范开. 重组赖氨酸内肽酶构建表达及活性方法研究. 重庆理工大学学报：自然科学版，2015，29（4）：53-59.
Ma Y，Fu Z C，Fan K. Research of recombinant lysine endopetidase construction expression and activity. Journal of Chongqing University of Technology：Natural Science，2015，29（4）：53-59.
[24]Ito L，Shiraki K，Uchida T，et al. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of Achromobacter protease I mutants. Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications，2010，66（11）：1531-1532.
[25]Achour B，Barber J. The activities of Achromobacter lysyl endopeptidase and Lysobacter lysyl endoproteinase as digestive enzymes for quantitative proteomics. Rapid Communications in Mass Spectrometry，2013，27（14）：1669-1672.
[26] Guo Z G，Cheng J，Sun H D，et al. A qualitative and quantitative evaluation of the peptide characteristics of microwave- and ultrasound-assisted digestion in discovery and targeted proteomic analyses. Rapid Communications in Mass Spectrometry，2017，31（16）：1353-1362.
[27] Paulo J A，Mancias J D，Gygi S P. Proteome-wide protein expression profiling across five pancreatic cell lines. Pancreas，2017，46（5）：690-698.
[28]Kishimoto T，Kondo J，Takai I T，et al. Accurate mass comparison coupled with two endopeptidases enables identification of protein termini. Proteomics，2011，11（3）：485-489.
[29] Guan X，Brownstein N C，Young N L，et al. Ultrahigh-resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and tandem mass spectrometry for peptide de novo amino acid sequencing for a seven-protein mixture by paired single-residue transposed Lys-N and Lys-C digestion. Rapid Communications in Mass Spectrometry，2017，31（2）：207-217.
[30] Raijmakers R，Neerincx P，Mohammed S，et al. Cleavage specificities of the brother and sister proteases Lys-C and Lys-N. Chemical Communications (Cambridge，England)，2010，46（46）：8827-8829.
[31]Brownstein N C，Guan X，Mao Y，et al. Paired single residue-transposed Lys-N and Lys-C digestions for label-free identification of N-terminal and C-terminal MS/MS peptide product ions: ultrahigh resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and tandem mass spectrometry for peptide de novo sequencing. Rapid Communications in Mass Spectrometry，2015，29（7）：659-666.
[32] Tofteng A P，Jensen K J，Schäffer L，et al. Total synthesis of desB30 insulin analogues by biomimetic folding of single-chain precursors. A European Journal of Chemical Biology，2008，9（18）：2989-2996.

[33]Maiorino M I，Petrizzo M，Capuano A，et al. The development of new basal insulins：is there any clinical advantage with their use in type 2 diabetes? expert opinion on biological therapy. 2014，14（6）：799-808.

[34]夏晶. 一种甘精胰岛素及其类似物的制备方法. 中国专利，CN 102816785 A，2012-12-12. Xia J. A process for preparation of insulin glargine and analogues. Chinese patent，CN 102816785 A，2012-12-12.

[35]Partha H，Srikanth G S，Suma S，et al. A process for preparation of insulin compounds. International patent，WO2010016069，publication date：2010-02-11.

[36] Cao H，Deterding L J，Blackshear P J. Identification of a major phosphopeptide in human tristetraprolin by phosphopeptide mapping and mass spectrometry. Public Library of Science One，2014，9（7）：e100977.

[37]Imamura H，Sugiyama N，Wakabayashi M，et al. Large-scale identification of phosphorylation sites for profiling protein kinase selectivity. Journal of Proteome Research，2014，13（7）：3410-3419.

[38] Cheng Y，Chen Y，Yu C. Fast and efficient non-reduced Lys-C digest using pressure cycling technology for antibody disulfide mapping by LC-MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis，2016，129：203-209.

[39] Du Y，Wang F，May K，et al. LC-MS analysis of glycopeptides of recombinant monoclonal antibodies by a rapid digestion procedure. Journal of chromatography B，2012，907：87-93.

[40]宋智心，田恩冰，马怀安，等. 探讨 Lys-C 胰蛋白酶对于质谱法测定糖化血红蛋白的应用价值. 国际检验医学杂志，2013，34（3）：257-259.

Song Z X，Tian E B，Ma H A，et al. Application value of Lys-C trypsin for the detection of HbA 1c by using mass spectrometric method. International Journal of Laboratory Medicine，2013，34（3）：257-259.